

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-73095

(43)公開日 平成6年(1994)3月15日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		8517-4H		
A 6 1 K 37/02	ABD	8314-4C		
	ADU	8314-4C		
C 1 2 P 21/02	K	8214-4B		
		8931-4B		
		C 1 2 N 15/ 00		A
		審査請求 有	発明の数 1(全 14 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-202977
 (62)分割の表示 特願平3-108789の分割
 (22)出願日 昭和59年(1984)12月25日

(71)出願人 000002912
 大日本製薬株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号
 (72)発明者 山田 正明
 京都府京都市北区紫野西蓮台野町13番地
 (72)発明者 古谷 泰治
 大阪府豊中市上新田2-6-25-110
 (72)発明者 山吉 迪子
 大阪府豊中市西緑丘3丁目8番14号
 (72)発明者 野竹 三津恵
 大阪府吹田市山田北15番5-601号
 (72)発明者 山岸 純一
 大阪府豊中市上新田2丁目23の14
 (74)代理人 弁理士 坪井 有四郎

(54)【発明の名称】 ヒト インターロイキン1活性を有するポリペプチド

(57)【要約】

【構成】 ヒト インターロイキン1 α をコードするDNAを微生物中で増殖可能な形質発現ベクターに組み込み、形質発現ベクターを構築し、これを用いて微生物を形質転換し、この形質転換体を培養することより産生されるヒト インターロイキン1活性を有するポリペプチド。

【効果】 免疫応答、生体の防御及びその修復等に関与するので、免疫不全症に対する治療薬や抗腫瘍剤として期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するヒト インターロイキン1 α 前駆体又はその対立遺伝子変異体又は該前駆体若しくは変異体のN末端領域をヒト インターロイキン1活性が消失しない限度において欠失せしめたアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項2】 ヒト インターロイキン1 α 前駆体又はその対立遺伝子変異体のN末端側の少なくとも62アミノ酸残基が欠失してなるポリペプチドである請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】 ヒト インターロイキン1 α 前駆体のN末端側の62アミノ酸残基が欠失してなるポリペプチドである請求項1記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒト インターロイキン1をコードするクローン化DNAを組み込んだベクターにより形質転換された宿主を培養することにより生産されるヒト インターロイキン1及びそれと実質的に同等の生物活性を有する物質に関する。

【0002】

【従来の技術】Geryらはヒト マクロファージの培養上清中に、マイトゲンによるマウス胸腺細胞分裂作用を促進させる物質を見出し、これをリンバ球活性化因子 (lymphocyte activating factor、以下LAFと略記する)と名付けたが、1979年以降、インターロイキン1 (以下、IL-1と略記する)の名称が用いられている。従って本明細書においてもこのような物質をインターロイキン1として扱う。

【0003】IL-1はT細胞やB細胞の増殖分化を促進させ、またT細胞に作用してリンホカイン、特にインターロイキン2 (T細胞増殖因子)の産生を促進させる効果を有し、抗体産生や細胞性免疫の調節に重要な役割を果たす因子の一つと考えられている (Staruch, M. J., et al.; J. Immunol., 130, 2191 (1983))。その他、プロスタグランジンEやコラゲナーゼの産生促進、繊維芽細胞の増殖促進、又はインターロイキン2やインターフェロンの有するNK (ナチュラル キラー)細胞活性化作用を増強させる効果があると報告されている (Simon, P. L., et al., "Lymphokines" vol. 6, p. 47 (1982), Academic Press Inc., New York)。

【0004】このようにIL-1は免疫応答のみならず、生体の防御やその修復等にも関与する生体物質であり、免疫不全症に対する治療薬や抗腫瘍剤としての臨床応用が期待されている。

【0005】IL-1のこれまでの取得方法は、主としてマクロファージや末梢単核細胞又はマクロファージ様株化細胞 (例えばマウスP388D₁細胞)や単球性又は骨髄性白血病細胞等を適当な誘導剤の存在下で培養し、その培養上清中より単離するものである。

【0006】ヒトIL-1は、ヒト単球性白血病株化細胞であるU937細胞及びヒト末梢単核細胞の培養上清から分離精製され、その分子量が11,300及び15,000ダルトンであると報告されている (Mizel, S. B., et al., J. Immunol., 131, 1834 (1983); Schmidt, J. A., J. Exp. Med., 160, 772 (1984))。

【0007】最近、マウスP388D₁細胞を用いマウスIL-1をコードするcDNAをクローニングし、IL-1活性を有する156個のアミノ酸から成るポリペプチドを大腸菌で生産させることに成功したと報告されている (Lomedico, P. T., et al., Nature, 312, 458 (1984))。

【0008】

【発明の目的】本発明者らは、遺伝子組み換え技術を応用してヒトIL-1を製造すべく鋭意研究を続けた結果、ヒトIL-1をコードするクローン化DNAの単離に成功し、このクローン化DNAを組み込んだ組み換え体プラスミドで形質転換された微生物がIL-1を産生することを確認し、本発明を完成した。

【0009】更に詳述すれば、本発明者らはヒト白血病細胞をin vitroで分化誘導剤と共に培養し、マクロファージ様細胞に分化させた細胞をIL-1産生のための誘導剤と共に培養し、該細胞中にIL-1 mRNAを産生蓄積させ、このmRNAを鋳型としてcDNAライブラリーを作製し、この中からヒトIL-1をコードするDNAのクローン化に成功し、その塩基配列を決定した。そして、該クローン化DNAを形質発現ベクターに組み込ませ、該ベクターで形質転換された宿主中にヒトIL-1活性を有するポリペプチドを産生せしめることに成功した。この研究過程において、ヒトIL-1が前駆体として作られること及びその全アミノ酸配列を明らかにした。

【0010】

【発明の構成及び効果】ヒトIL-1前駆体をコードするDNAは配列番号1の塩基配列で表される。

【0011】配列番号1で示される塩基配列を有するDNAは、配列番号2で表されるポリペプチドをコードする。

【0012】ヒトIL-1の生物活性発現には、必ずしも配列番号2で表されるポリペプチドの全構造を必要としない。このことは配列番号2中、C末端から209残基のアミノ酸から成るポリペプチドはLAF活性を有していることから明らかである。

【0013】従って、配列番号2で表されるポリペプチドはヒトIL-1の前駆体であり、その生物活性に必須な部分はそのC末端側に存在すると考えられる。

【0014】ヒトIL-1をコードするDNAには、配列番号2に対応する塩基配列の全部もしくはその下流部を有するDNA及びその部分的に修飾されたDNA並びにこれらの対立遺伝子変異体DNAが包含される。

【0015】ヒトIL-1をコードするDNAを組み込んだ形質発現ベクターで形質転換された宿主により產生されるポリペプチド又はその分解物がヒトIL-1と実質的に同等な生物活性を有するか或いは潜在的にそのような活性を有する限り、これらのポリペプチドは本発明に係るポリペプチドに包含される。以下これらのポリペプチドを「本発明に係るポリペプチド」と総称する。

【0016】なお、上述の部分的に修飾されたDNAとは、配列番号1で表される全塩基配列又はその下流部の塩基配列において、一部のコドンが欠失及び／又は他のコドンで置き換えた塩基配列、及び／又は他のコドンが挿入及び／又は付加された塩基配列を有するDNAを意味する。

【0017】ヒトIL-1をコードするDNAは、ヒト白血病細胞を分化誘導剤と共に培養し、マクロファージ様細胞に分化させた細胞又はヒトマクロファージ或いはヒト末梢単核球を誘導剤と共に培養し、該細胞からヒトIL-1 mRNAを含む画分を分離し、これをもとにしてcDNAライブラリーを作製し、これよりヒトIL-1 cDNAをクローン化することにより製造することができる。

【0018】このヒトIL-1をコードするDNAは従来既知の手法を用いて、該DNAの塩基配列の一部のコドンが欠失及び／又は他のコドンで置き換えた塩基配列、及び／又は他の塩基配列が挿入及び／又は付加された塩基配列を有するDNAに修飾することができる。該DNA又はその修飾体DNAは更にそのコドンの一部を対応する縮重コドンと置き換えることも可能である。

【0019】ヒトIL-1をコードするDNAの製造法を工程順に示すと以下の通りである。

- (1) ヒトマクロファージ又はマクロファージ様細胞を誘導剤と共に培養する。
- (2) 該細胞からヒトIL-1 mRNAを含む画分を分離する。
- (3) 該mRNAを鋳型として逆転写酵素を用いてsscDNAを合成し、次いでdscDNAに変換する。
- (4) 該dscDNAをベクターに組み込む。
- (5) 該組み換え体を宿主に導入し、形質転換せしめcDNAライブラリーを作製する。
- (6) 該ライブラリーからヒトIL-1をコードするcDNAをクローニングする。
- (7) 所望により、該クローン化cDNAを改築する。

【0020】ヒトIL-1 cDNAを組み込んだ形質発現ベクターにより形質転換した宿主を培養し、その宿主中又は培地中にヒトIL-1の生物活性或いは潜在活性を有するポリペプチドを產生せしめることができる。

【0021】以下にヒトIL-1をコードするDNAの製造方法並びに本発明に係るポリペプチドの產生方法より具体的に説明する。

【0022】ヒトIL-1をコードするDNAの製造

I. ヒトIL-1 mRNAの調製

ヒト白血病細胞を用いる場合には、該細胞を $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個/mlの細胞密度で播き、これに分化誘導剤を添加する。分化誘導剤の添加量は、その種類、細胞の種類、培養条件等により異なるが、一般に約100 ~ 2,000 ng/ml (最終濃度) が好ましい。ヒト白血病細胞を分化誘導剤と共に35~38℃、好ましくは約37℃、約5~10%炭酸ガス含有空气中、湿度約90~100 %で約24~72時間培養する。

【0023】ここで使用しうるヒト白血病細胞としては分化誘導剤の作用によりマクロファージ様細胞に分化するヒト白血病株細胞はすべて用いることができる。例えばHL-60細胞(ATCC, CCL240), THP-1細胞, Mono-1-207細胞が挙げられる。また、白血病患者から分離した初代細胞も同様に用いることができる。

【0024】分化誘導剤としては、例えば、ホルボールエステル類、メゼレインのようなジテルペン系化合物が挙げられる。

【0025】培地としては、高等動物細胞の培養に適した各種合成培地が用いられ、例えばRPMI-1640, イーグルのMEM培地、ダルベッコ変法によるMEM培地[宗村庚修編「細胞培養マニュアル」, 講談社(1982) 及びCell and Tissue Culture, J. Paul, E. & S. Livingstone Ltd. (1970) 参照]が挙げられる。培地には全培養液量の約1~20%の動物血清(例えば牛胎児血清, 子牛血清)を加えておくのが好ましい。

【0026】細胞が培養容器面に付着し、マクロファージ様細胞に分化したことを確認した後、以下の操作を行う。なお、白血病細胞を用いることなく、肺、血液、腹腔、胎盤、脾臓等の組織から採取したヒトマクロファージを用いる場合には上記の分化誘導操作は省略できる。

【0027】上記の培養を行った後、培養液及び浮遊細胞を吸引除去する。次いで、IL-1の產生を誘導する誘導剤(例えばグラム陰性菌より得られたエンドトキシン)と、蛋白合成阻害剤(例えばシクロヘキシミド)を加え、更に3~8時間培養することにより、ヒトIL-1 mRNAを該分化細胞中に蓄積させる。エンドトキシンの場合の添加量は一般に約0.1~1000 $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは約1~100 $\mu\text{g/ml}$ であり、シクロヘキシミドの場合の好ましい添加量は0.1~50 $\mu\text{g/ml}$ である。

【0028】培養終了後、該細胞より、例えばChirgwinらの方法[Biochemistry, 18, 5294(1979)]により全RNAを抽出し、次いでこれを常法に従ってオリゴ(dT)セルロース又はポリ(U)セファロースなどを用いる吸着カラムクロマトグラフィーに付すか又はバッチ法によりポリ(A) mRNA画分を分離する。このポリ

(A) mRNA画分を酸性尿素アガロースゲル電気泳動又はショ糖密度勾配遠心分離に付すことによりヒトIL

-1 mRNAを濃縮精製することができる。

【0029】ここに得られたmRNA画分が目的とするヒトIL-1をコードするmRNAを含むものであることを確認するためには該mRNA画分をタンパクに翻訳させてその生物活性を調べればよい。例えば該mRNA画分をアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞に注入するか、又は網状赤血球ライセート、小麦胚芽のような適当な蛋白合成系に添加してタンパクに翻訳させ、そのタンパクがLAF活性を有することを確認すればよい。

【0030】II. ヒトIL-1 cDNAのクローニング
Iの工程で得られたmRNA画分を鋳型とし、オリゴ(dT)をプライマーとして、dATP, dGTP, dCTP, dTTPの存在下で逆転写酵素(例えばトリ骨髄性白血病ウイルス由来逆転写酵素)によりmRNAと相補的なsscDNAを合成し、次いでこのsscDNAを鋳型にして、逆転写酵素あるいは大腸菌DNAポリメラーゼI(ラージフラグメント)等を用いてdscDNAを合成する。ここに得られたdscDNAを、ポリ(dG)-ポリ(dC)ホモポリマー伸長法[Nelson, T.S., "Methods in Enzymology", 68, 41 (1979), Academic Press Inc., New York参照]のような常法に従って、例えばプラスミドpBR322の制限酵素PstI切断部位に組み込ませる。得られた組み換え体プラスミドを、例えばCohenらの方法[Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972) 参照]に準じて例えばE. coli x1776株のような宿主に導入して形質転換させ、テトラサイクリン耐性株を選択してcDNAライブラリーを作製する。

【0031】このcDNAライブラリーからヒトIL-1をコードするcDNAが組み込まれた組み換え体プラスミドを含む形質転換体を得るには、次の方法を用いることができる。例えばヒト以外の動物からIL-1をコードするcDNAが得られればそのcDNAをプローブとして用い、コロニーハイブリダイゼーション試験[Hanahan, D., et al., Gene, 10, 63 (1980)]を行うことにより該cDNAプローブと相同性のある塩基配列を含むcDNAを有するクローンを該cDNAライブラリーから釣り上げることができる。

【0032】また、上述したような適当なプローブがない場合には、プラスマイナス法によるコロニーハイブリダイゼーション試験でスクリーニングすればよい。即ち、Iの工程で得られたヒトIL-1 mRNA画分を鋳型として³²P標識cDNAを合成し、これを誘導プラス・プローブとする。別途に、分化誘導操作及び/又はエンドトキシン等による誘導操作を省略した無処理の細胞から全RNAを抽出し、さらにIに示したのと同じ操作により調製したポリ(A)mRNA画分を鋳型として、³²P標識cDNAを合成し、これを誘導マイナス・プローブとする。

【0033】上記のcDNAライブラリーの中から、誘導プラス・プローブと強く結合し、誘導マイナス・プローブとは結合しないクローンをコロニーハイブリダイゼーション試験[Hanahan, D., et al., Gene, 10, 63 (1980)]により選択する。

【0034】ここに得られたクローンがヒトIL-1をコードするcDNAを含有する組み換え体プラスミドにより形質転換された宿主のクローンであることを確認し、且つさらにスクリーニングするために、以下のハイブリダイゼーション・トランスレーション試験を行う。即ち、上記の選択されたクローンからプラスミドDNAを分離し、加熱又はアルカリ変性により単鎖DNAとし、ニトロセルロースフィルターに固定する。これにヒトIL-1 mRNAを含むmRNA画分を加えハイブリダイズさせた後、結合したmRNAを溶出回収する。これをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、回収された上記のmRNAがヒトIL-1をコードしているか否かを試験すればよい。

【0035】以上の方法により、ヒトIL-1 mRNAと相補性のある塩基配列を含むDNA断片が組み込まれたプラスミドを有する形質転換体のクローンを得ることができる。

【0036】このようにして得られるいくつかのクローン化DNA断片について例えばMaxam-Gilbert法[Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560 (1977)]又はM13ファージを用いるジデオキシ法[Sanger, F., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977) 及びMessing, J., "Methods in Enzymology", 101, 20 (1983), Academic Press Inc., New York]に従って塩基配列を解析することによりヒトIL-1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列を有するクローン化cDNAを最終的に得ることができる。

【0037】かくして得られたクローン化DNAは、必要により常法に従い、(1) その塩基配列の一部のコードが欠失した塩基配列、及び/又は(2) その塩基配列の一部のコードが他のコードで置き換った塩基配列を有し又は含むDNAに改築することができる。また、上記DNAは、その一部のコードを対応する縮重コードと置き換えてもよい。

【0038】本発明に係るポリペプチドの製造
上記のようにして得られたクローン化DNAを適当な形質発現ベクターに組み込んで本発明のポリペプチド生産用ベクターを得ることができる。ベクターとしては、形質転換させる微生物中で増殖するものはすべて用いることができる。例えばプラスミド(大腸菌プラスミド、pBR322など)、ファージ(ラムダファージ誘導体など)、ウイルス(SV40など)が挙げられる。これらは単独で、又はそれらの組合せ、例えばpBR322-SV40ハイブリッド・プラスミドなどの形で用いてもよい。そのDNAの組み込み部位も任意に選択すること

ができる。即ち、適当な形質発現ベクターの適当な位置を常法により適当な制限酵素を作用させて開裂させ、その開裂部位に該クローン化DNAを適当な長さに処理して組み込むことができる。

【0039】更に詳細には、配列番号2で示されるアミノ酸配列又はそのC末端部からなるポリペプチドをコードするDNAに、必要に応じてその5'末端に開始コドンATGを付加し、そして3'末端に終止コドン(TAA, TAG又はTGA)を含む塩基配列をもつDNA断片を、適当なプロモーター及びシャイン・ダルガーノ(SD)配列に続いて結合させ、ベクター(例えばプラスミド)に組み込むことにより、非融合型の該ポリペプチド生産用の形質発現ベクターを構築する。また、融合型の該ポリペプチド生産用の形質発現ベクターは、宿主中で発現し得るオペロンの構造遺伝子の翻訳領域の途中に読み枠をあわせて、上記の塩基配列を含むDNA断片を挿入すればよい。

【0040】プロモーターとしては、例えば lac, trp, tac, phoS, phoA, PL, SV40 初期プロモーター等が挙げられる。

【0041】これらの形質発現ベクターを微生物又は動物細胞のような宿主、例えば大腸菌に、例えばCohenらの方法[Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]により導入することにより形質転換体を得、次いで該形質転換体を培養することにより目的とするポリペプチド又はそのN末端にメチオニンが結合したポリペプチドを産生させることができる。該生産物は使用したプロモーターと形質発現ベクターの構築法により、宿主中の細胞質内又は細胞質外のいずれにも蓄積させることができる。細胞質外に分泌させるには、分泌型蛋白の遺伝子、例えばアルカリホスファターゼ遺伝子(phoA)やリン酸結合蛋白遺伝子(phoS)を用い、それらのシグナルペプチドをコードする領域に続いて目的とするポリペプチドをコードするDNAを結合させた形質発現ベクターを構築すればよい。このようにして得られた形質転換体を、それぞれの形質転換体に応じた適当な培養条件下で、目的のポリペプチドが十分に産生されるまで培養したのち、培養物からポリペプチドを抽出する。産生したポリペプチドが細胞質内に蓄積される場合は例えば、リゾチーム消化と凍結融解や超音波破碎、フレンチプレス等により宿主細胞を破壊したのち、遠心分離又は濾過にて抽出液を集める。また、ペリプラスムに蓄積される場合は、例えばWilliskyらの方法[J. Bacteriol., 127, 595 (1976)]に従って抽出することができる。

【0042】上記のようにして得られた粗製の本発明に係るポリペプチドは一般的な蛋白の精製法、例えば限外濾過、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、電気泳動、アフィニティクロマトグラフィー等の組み合わせにより精製することができる。更に、得られたポリペプチドを酵素等で処理して、他のポリペプチドに

誘導することもできる。

【0043】本発明に係るポリペプチドの製剤化にあたっては、溶液及び凍結乾燥品のいずれでも良いが、長期安定性の点から凍結乾燥品が望ましい。そして賦形剤や安定化剤を添加するのが好ましい。安定化剤としては、例えばアルブミン、グロブリン、ゼラチン、プロタミン塩、グルコース、ガラクトース、キシロース、マンニト、グルクロン酸、トレハロース、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、非イオン界面活性剤(ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマー、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル)等が挙げられる。

【0044】本明細書では記載の簡略化のために以下の略記を使用する。

A	アデニン
C	シトシン
G	グアニン
T	チミン
Ala	アラニン
Arg	アルギニン
Asn	アスパラギン
Asp	アスパラギン酸
Cys	システイン
Gln	グルタミン
Glu	グルタミン酸
Gly	グリシン
His	ヒスチジン
Ile	イソロイシン
Leu	ロイシン
Lys	リジン
Met	メチオニン
Phe	フェニルアラニン
Pro	プロリン
Ser	セリン
Thr	スレオニン
Trp	トリプトファン
Tyr	チロシン
Val	バリン
DNA	デオキシリボ核酸
cDNA	相補DNA
sscDNA	単鎖cDNA
dscDNA	二重鎖cDNA
RNA	リボ核酸

mRNA	伝令RNA
dATP	デオキシアデノシン三リン酸
dCTP	デオキシチジン三リン酸
dGTP	デオキシグアノシン三リン酸
dTTP	デオキシチミジン三リン酸
オリゴ (dC)	オリゴデオキシチジル酸
オリゴ (dG)	オリゴデオキシグアニル酸
オリゴ (dT)	オリゴデオキシチミジル酸
ポリ (A)	ポリアデニル酸
ポリ (U)	ポリウリジル酸
ポリ (dA)	ポリデオキシアデニル酸
ポリ (dC)	ポリデオキシチジル酸
ポリ (dG)	ポリデオキシグアニル酸
ポリ (dT)	ポリデオキシチミジル酸
ATP	アデノシン三リン酸
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
kb	キロ塩基
kb p	キロ塩基対
b p	塩基対

【0045】

【実施例】以下に実施例、参考例及び試験例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0046】また下記の実施例等の説明の理解を容易にするため図1～図3を示した。図1～図3は形質発現ベクターpHLP101の構築工程を示す。

【0047】実施例1

ヒトIL-1をコードするcDNAのクローニング及び塩基配列の決定

(1) 急性骨髄性白血病株細胞 (HL-60細胞) からヒトIL-1 mRNAの調製

【0048】HL-60細胞をベトリディッシュ (直径8cm) に 1×10^7 個/10ml/dishの条件で播いた。培養液には10%牛胎児血清含有のRPMI-1640培地を用い、分化誘導剤としてホルボール-12-ミリステート-13-アセテートとビタミンA酸をいずれも最終濃度として500 ng/mlになるように添加した。37℃で5%炭酸ガス含有空气中、湿度90～100%で2日間培養した後、培養液と浮遊細胞を吸引除去した。分化した細胞が付着したディッシュに10%牛胎児血清含有RPMI-1640培地に誘導剤としてエンドキシシン (大腸菌由来のリポポリサッカライド) を10 μ g/ml濃度に、蛋白合成阻害剤としてシクロヘキシミドを1 μ g/ml濃度に添加した培地の10mlを加え、更に5時間培養した。培養終了後、培養液を吸引除去し、ディッシュ上に残った分化細胞を0.5%ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、5mMクエン酸ナトリウム及び0.1M2-メルカプトエタノールを含む6Mグアニジンチオシアネート液で溶解し、ホモジナイズした。このホモジネートを0.1MEDTA含有5.7M塩化セシウム水溶液上に重層し、超遠心分離機 (RPS

27-2 ローター、日立工機) を用い26,500rpmで20時間遠心し全RNA画分をペレットとして得た。これを0.35M NaCl, 20mM Tris及び20mMEDTAを含む7M尿素液の少量に溶解し、エタノール沈澱として回収した。HL-60細胞の 1.5×10^8 個より全RNAとして1.7mgが得られた。

【0049】この全RNA画分を1mMEDTAを含む10mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) (以下TE液という) 2mlに溶解し、65℃で5分間加熱した。これにNaCl溶液を0.5Mとなるように加えた後、あらかじめ0.5M NaClを含むTE液で平衡化したオリゴ (dT) セルロースカラムに付し、吸着したポリ (A) mRNAをTE液で溶出することにより、75 μ gのポリ (A) mRNAを得た。このポリ (A) mRNAをアフリカツメガエルの卵母細胞にマイクロインジェクション法で注入し、その10個を100 μ lのパーズ培養液 [Gurdon, J. B., J. Embryol. Exp. Morphol., 20, 401 (1968)] 中、22℃で24時間培養し、ホモジナイズした後、その遠心分離上清液を検液として、LAF活性を測定した [測定法は試験例 (2) 項参照]。その結果、卵母細胞1個当たり、ポリ (A) mRNAの約150 ngを注入し、上記培養条件で培養して得た検液の320倍希釈液で約15,000～18,000cpmの³H-チミジンの取込みを認め、該ポリ (A) mRNA調製品中にIL-1 mRNAが含まれていることを確認した。

【0050】ここで得られたポリ (A) mRNAを以下の実験に用いた。

【0051】(2) cDNAの合成

(1) 項で得られたポリ (A) mRNAを鋳型としてGublerらの方法 [Gene, 25, 263 (1983)] に準じてcDNAを合成した。該ポリ (A) mRNA (6 μ g) を6 μ lの蒸留水に溶解させ、これに0.6 μ lの100 mM酸化メチル水銀水溶液を添加し室温で10分間放置した。次いで、20単位のRNA分解酵素阻害剤 [RNasin (登録商標), Promega Biotec社製品] を含む500 mM2-メルカプトエタノール液の1.7 μ lを添加した。室温で5分間放置した後、更に10mM MgCl₂, 1.25mM dGTP, 1.25mM dATP, 1.25mM dTTP, 0.5 mM dCTP, 0.17 μ M α -³²P-dCTP (比活性, 750 Ci/mmol), 4 μ g オリゴ (dT)₁₂₋₁₈, 120 単位トリ骨髄性白血病ウイルス由来逆転写酵素を含む32 μ lの50mM Tris-HCl (pH 8.3) 緩衝液を添加し、42℃で60分間反応させた後、EDTAを加えて反応を停止させた。フェノール/クロロホルム混液 (1:1) で抽出し、その水層に酢酸アンモニウムを終濃度2.5Mになるように加え、エタノールにより反応生成物 (sscDNA-mRNA複合体) を沈澱させた。このsscDNA-mRNA複合体を下記組成の反応緩衝液100 μ lに溶解した。

【0052】反応緩衝液組成: 5mM MgCl₂, 10mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 0.15mM β -ニコチン

アミド アデニン ジヌクレオチド, 40 μ M dGTP, 40 μ M dATP, 40 μ M dTTP, 40 μ M dCTP, 及び 5 μ g ウシ血清アルブミン, 1.25 単位大腸菌リボヌクレアーゼH, 24 単位大腸菌DNAポリメラーゼIを含む 20mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液。

【0053】該溶解液を12℃で60分間反応させ、これに 2.5 単位の大腸菌DNAリガーゼを添加し、更に22℃で60分間反応させた。EDTAを加えて反応を停止させた後、上記と同様にフェノール/クロロホルム混液で抽出し、エタノールにより反応生成物 (ds cDNA) を沈澱させ、回収した。

【0054】

(3) オリゴ (dC) テール付加 cDNA の調製

(2) 項で得られた ds cDNA を下記組成の反応緩衝液 100 μ l に溶解させ、37℃で30分間反応させ、ds cDNA にオリゴ (dC) テールを付加させた。反応緩衝液組成: 2mM CoCl₂, 0.2mM ジチオスレイトール, 0.1 mM α -³²P-dCTP (比活性 1Ci/mmol) 及び 10 単位ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼを含有する 100 mM カコジル酸ナトリウム (pH 7.2)。

【0055】反応は EDTA 水溶液を添加して停止させ、フェノール/クロロホルム混液で抽出し、オリゴ (dC) テール付加 ds cDNA をエタノールにより沈澱させ回収した。これを 1mM EDTA 及び 100mM NaCl を含む 10mM Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液にて、2 μ g/ml の濃度に溶解させた。

【0056】(4) 組み換え体プラスミドの作製

オリゴ (dG) 付加 pBR322 (Bethesda Res. Lab. Inc. 製) と (3) 項で得られたオリゴ (dC) 付加 ds cDNA を 1.5 ml の 1mM EDTA 及び 100 mM NaCl を含む 10mM Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液中、それぞれ 1.5 μ g 及び 0.09 μ g 含むように溶解混合させた後、65℃で10分間、57℃で2時間、更に45℃で2時間加温しアニーリングを行い、組み換え体プラスミド溶液を調製した。

【0057】(5) 形質転換体の選択

(4) 項で得られた組み換え体プラスミド溶液を用い、*E. coli* x1776 株を形質転換させた。即ち、*E. coli* x1776 株を、ジアミノピメリン酸 100 μ g/ml 及び チミジン 40 μ g/ml を補ったレーブロス (組成: 11 当たりトリプトン 10 g, 酵母エキス 5 g, NaCl 5 g, ブドウ糖 1 g, pH 7.2) 20ml 中、37℃で吸光度 (600 nm) が 0.5 となるまで培養し、菌体を遠心分離し、50 mM CaCl₂ 含有 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.3) 10ml にて洗浄した。

【0058】集めた菌体を同じ緩衝液 2ml に懸濁させ、0℃で5分間静置した。この懸濁液 0.2 ml に上記組み換え体プラスミド溶液 0.1 ml を添加混合し、0℃で15分間静置し、更に42℃で2分間保持した後、上記の培養で用

いたのと同じ組成のレーブロス 0.5 ml を加えて 1 時間振盪培養を行った。この培養液の一部を取り、上記組成に加えてテトラサイクリン (15 μ g/ml) が添加されたレーブロス寒天平板に広げて 37℃で約 12 時間培養し、テトラサイクリン耐性菌を選択して cDNA ライブラリーを作製した。

【0059】(6) クローニング

(5) 項で得られた cDNA ライブラリーから ヒト IL-1 をコードする cDNA を含むプラスミドを有する形質転換体をスクリーニングするため、参考例に示したウサギ IL-1 をコードすると思われるクローン化 cDNA をプローブとして用い、コロニー ハイブリダイゼーション試験を行った。

【0060】参考例に示した方法により得た組み換え体プラスミド pRL15 から制限酵素 Pst I により組み込まれた cDNA 断片 (約 1.1 kbp) を切り出し、これを ³²P にて標識しプローブとした。

【0061】約 2 万個のクローンから、該 ³²P 標識プローブと強く結合する塩基配列を含む cDNA を有するクローンを 5 個選り出した。この 5 クローンの中から 2 kb p 以上の大きさの cDNA が挿入された組み換え体プラスミドを含む 2 クローンを選び、ハイブリダイゼーション トランスレーション試験を行った (Maniatis, T., et al., "Molecular Cloning" 329 (1980), Cold Spring Harbor Lab.)。各クローンによりプラスミド DNA を抽出し、ニトロセルロース フィルター上に加熱変性させた後固定し、これに上記 (1) 項で得た ヒト IL-1 mRNA を含む画分を含むポリ (A) mRNA を加え、50℃で5時間反応させ、ハイブリダイズさせた。結合した mRNA を溶出回収した後、アフリカツメガエル の卵母細胞に注入し、回収された mRNA が IL-1 をコードするものであるか否かについて検定した。この試験により、いずれのクローンについても ヒト IL-1 mRNA と強くハイブリダイズする cDNA が組み込まれたプラスミドを含むことを確認した。

【0062】この 2 クローンから約 2.1 kbp の大きさの cDNA が挿入された組み換え体プラスミド (プラスミド番号 pHL4 ; クローン番号 x1776 / pHL4) について、クローン化 cDNA を単離し下記の方法で塩基配列を決定した。

【0063】

(7) クローン化 cDNA の塩基配列の決定

(6) 項で選択された形質転換体 (x1776 / pHL4) をジアミノピメリン酸及びチミジンを添加したレーブロス [(5) 項参照] で培養し、その菌体から Wilkie らの方法 (Nucleic Acids Res., 7, 859 (1979)) に従って、プラスミド DNA を得た。このプラスミド DNA を制限酵素 Pst I で分解し、分離精製してクローン化 cDNA を得た。

【0064】制限酵素 Sac I, Rsa I, Hind I

II, HincII, Fnu4HI, HinfI, BalI 及び EcoRI を用い、それぞれ単独または2種の制限酵素の組み合わせにより、上記クローン化cDNAを分解し、150 ~ 700bp のDNA断片を切り出し、分離精製して塩基配列解析に用いた。

【0065】各DNA断片の塩基配列はM13ファージを用いるジデオキシ法にて決定した。M13mp18及びM13mp19 (Pharmacia P-L Biochemicals社製) をクローニングベクターとし、M13シーケンシングキット (Amersham International plc社製) を用い、「M13クローニング及びシーケンシング ハンドブック」 (Amersham International plc社製) に従って実施した。

【0066】その塩基配列及びその塩基配列から推測されるアミノ酸は配列番号3に示すとおりである。

【0067】第61~63番の塩基が開始コドンATGであり、第874 ~ 876 番の塩基は終止コドンTAGである。

【0068】このアミノ酸配列からは、典型的なシグナルペプチドの配列 [Von Heijne, G., Eur. J. Biochem., 133, 17 (1983)] は存在しない。これはマウスIL-1の例にも認められている [Nature, 312, 458 (1984)]。

【0069】実施例2

ヒトIL-1ポリペプチドの生産

(1) ヒトIL-1生産用形質転換体の作製

trpプロモーターを用いて、ヒトIL-1生産用形質発現ベクターを図1~図3に示すように構築した。実施例1-(7)項に示すごとく組み換え体プラスミドpHL4からヒトIL-1をコードする塩基配列を含むクローン化cDNAを得た。該cDNA (20 μ g) を100 μ l の反応緩衝液 [50mM NaCl, 6mM MgCl₂ 及び6mM 2-メルカプトエタールを含む10mM Tris-HCl (pH7.5) 緩衝液] に溶解し、制限酵素HindII (240 単位) にて37°Cで60分間反応させた後、更に100 μ l の0.2M NaClを加え、制限酵素ScaI (100 単位) にて37°Cで60分間反応させた。次いで、NaClを終濃度0.3Mになるように加え、更に2倍容のエタノールを添加し、DNA断片を沈殿させ回収した。これを5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付しヒトIL-1をコードする領域を含む約1.6kbpのDNA断片を分離精製し、約5 μ g 得られた。

【0070】このDNA断片に配列番号4で示される下記の合成オリゴヌクレオチド アダプター

5' -CGTCCATGTCCA

3' -AGGTACAGGTTCA

をT₄ DNAリガーゼを用いて結合させた。ここに得られたDNA断片を、以下HIL-アダプター断片という。

【0071】一方、trpプロモーター ベクターpDR720 [Russell, D.R., et al., Gene, 20, 231 (198

2) ; Pharmacia P-L Biochemicals社製] に制限酵素EcoRIとHpaIを作用させ、trpプロモーター領域の一部を含むDNA断片 (35bp) を切り出し、そのHpaIにより切断された平滑末端に続いて、これに配列番号5で示される下記の合成オリゴヌクレオチド アダプター

5' -AACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTAT

3' -TTGATCATGCGTTCAAGTGCATTTTCCCATAGC

をT₄ DNAリガーゼを用いて結合させた。ここに得られたDNA断片を、以下trpプロモーター断片という。

【0072】別途に、プラスミドpBR322の20 μ gを100 μ l の上記反応緩衝液に溶解し、制限酵素HindIII (180 単位) にて、37°Cで60分間反応させた後、フェノール/クロロホルム混液による抽出後、エタノール沈殿としてDNAを回収し、これを20 μ l のTE液 [実施例1-(1)項参照] に溶解した。該溶解液の10 μ l をとり、これに40 μ l の反応緩衝液 [12.5mM MgCl₂, 0.125mM ジチオスレイトール, 0.25mM dGTP, 0.25mM dATP, 0.25mM dTTP, 0.25mM dCTP, 2.5 μ g のウシ血清アルブミン, 及び2.6 単位の大腸菌DNAポリメラーゼI (ラージフラグメント) を含む62.5mM Tris-HCl (pH 7.2) 緩衝液] を添加し、20°Cにて60分間反応させた後、反応生成物をフェノール/クロロホルム混液による抽出、次いでエタノールにより沈殿させ回収し、これを20 μ l のTE液に溶解した。以上の操作により、pBR322 DNAを制限酵素HindIII で開裂させ、次いで得られた直鎖二重鎖DNAの末端を平滑末端に修復したDNAが得られた。更に、該DNAを制限酵素EcoRIにより2つの断片に切断し、アンピシリン耐性遺伝子を含む大きなDNA断片 (約4.3kbp) を分離精製した (以下、このDNA断片をpBR322-Amp^r断片という)。

【0073】上記HIL-アダプター断片とtrpプロモーター断片のそれぞれ制限酵素ClaIの粘着末端をT₄ DNAリガーゼを用いて結合させた。このようにして得られた両端にそれぞれ制限酵素EcoRIの粘着末端と、平滑末端をもつDNA断片を、上記pBR322-Amp^r断片とT₄ DNAリガーゼを用いて結合させ、ヒトIL-1生産用形質発現ベクター (pHLP101) を構築した。

【0074】この形質発現ベクターを下記の方法によりE. coli HB101に導入し形質転換体を得た。即ち、E. coli HB101をL-ブロス (組成: 11 当たり、トリプトン10g, 酵母エキス5g, NaCl 5g, ブドウ糖1g, pH7.2) の5mlに接種し、37°Cで一晩培養した。その菌体懸濁液の1mlを100ml のL-ブロスに接種し、濁度 (吸光度650nm) が0.6 になるまで37°Cで培養した。氷水中で30分間静置後、菌体を遠心分離により集め、これを50mlの50mM CaCl₂ に懸濁し、0°Cで60分

間静置した。次いで、遠心分離により菌体を集め、20%グリセリンを含む50mM CaCl_2 の10mlに再懸濁した。

【0075】この懸濁液に上記の形質発現ベクター pHLP101を添加し、これを氷水中で20分間、42℃で1分間、室温で10分間インキュベートした後、LB-ブロス（組成は次項参照）を加え、37℃で60分間振盪した。その菌体懸濁液の一部を25 μg /mlアンピシリンを含むLB-寒天平板に播き、37℃で一夜培養した後、アンピシリン耐性クローンを選択して形質転換体を得た。この形質転換体をHB101/pHLP101と名づけた。

【0076】(2) ヒトIL-1ポリペプチドの生産

(1) で得た形質転換体HB101/pHLP101をLB-ブロス（組成：11 当たり、トリプトン10g、酵母エキス5g 及びNaCl 10g、pH7.5）中37℃で一夜振盪培養した。その菌体懸濁液の0.1ml を10mlの改良M9培地（組成：1.5 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3 % KH_2PO_4 、0.05 % NaCl、0.1 % NH_4Cl 、2m g /l ビタミン B_1 、0.5 % カザミノ酸、2mM MgSO_4 、0.1mM CaCl_2 、0.5 % ブドウ糖）に接種し、37℃で1時間培養し、次いでインドール-3-アクリル酸を終濃度20 μg /mlになるように加え、更に24時間培養を継続した後、遠心分離により菌体を集めた。菌体を1mlの30mM NaClを含む50mM Tris-HCl (pH8.0) 緩衝液に再懸濁し、0℃で30分間静置した後、ドライアイス/エタノール浴での凍結と37℃での融解を6回繰り返した。次いで、遠心分離により菌体残渣を除き、清澄な上清液を得た。

【0077】この上清液を検体として、試験例に示すごとくLAF活性を測定した。

【0078】試験例

LAF（リンパ球活性化因子）活性測定

(1) 検液の調製

実施例2-(2)項で得られた形質転換体からの抽出上清液を除菌フィルター（Microflow（登録商標）、孔径0.2 μm 、Flow Labs.）で濾過したものを以下のLAF活性測定用の検液とした。

【0079】(2) LAF活性の測定法

検液を培地にて適当な濃度に希釈する。その希釈液の50 μl を96穴組織培養用マイクロプレート（Flow Labs.）のウェルに入れる。これに50 μg /ml濃度のフィトヘマグルチニン（Difco Labs.）液の50 μl を添加する。更に、C3H/He系マウス（6～10週令）から採取した胸腺細胞の懸濁液（ 1×10^7 個/ml）の100 μl を添加し、37℃で5%炭酸ガス存在下で2日間培養する。

【0080】培地には5%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地を用いる。上記2日間の培養の後、 ^3H -チミジンの1 μCi を添加し、更に18時間培養する。細胞をタイターテック・セルハーベスター（Flow Labs.）により、ガラス繊維製フィルター（Flow Labs.）上に捕集し、細胞中に取り込まれた ^3H -チミジン量（cpm）を

計測する。検液の代わりに培地を添加した測定系における ^3H -チミジンの取り込み量を基準として、 ^3H -チミジン取り込み量の増加によりLAF活性を評価する。

【0081】(3) 測定結果

(1)項で調製した形質転換体（HB101/pHLP101）の抽出液及び陰性対照液としてプラスミドpBR322を含むE. coli HB101（HB101/pBR322）を実施例2-(2)項で示した条件で培養し、得られたその菌体抽出液をそれぞれ検液とした。

【0082】その結果、検液の代わりに培地を添加した測定系での ^3H -チミジンの取り込み量は、3,502 cpmであった。陰性対照検液を添加した系（最終希釈倍数：16倍）での取り込み量は574cpmであり、E. coli抽出液の添加により有意な抑制が認められた。

【0083】このような測定系において、形質転換体（HB101/pHLP101）の抽出液では最終希釈16倍で8,103 cpmの ^3H -チミジンの取り込みを認め、LAF活性が検出された。

【0084】参考例

ウサギIL-1 cDNAの調製

(1) ウサギIL-1 mRNAの調製

ウサギにPropionibacterium acnes死菌体を1羽当たり100 mgの投与量で静脈内に注入し、8日後に屠殺した。直ちに開胸気管切開し、気管内に挿入したチューブを介してリン酸緩衝生理食塩液を用い肺洗浄を繰り返して、肺泡マクロファージを採取した。この肺泡マクロファージを10%牛胎児血清含有のRPMI-1640培地に懸濁させてペトリディッシュ（直径8cm）に1枚当たり 1×10^7 個となるように播き、37℃で5%炭酸ガス含有空気中、湿度90～100%で前培養した。1時間の前培養の後、エンドトキシン（大腸菌由来のリボポリサッカライド）、TPA（ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート）及びシクロヘキシミドをそれぞれ最終濃度が10 μg /ml、500 ng/ml及び1 μg /mlとなるように添加混和し、更に培養を継続した。

【0085】4時間後に培養液を吸引除去し、ディッシュ上に残ったマクロファージを0.5%ラウロイルサルコシン酸ナトリウムと5mMクエン酸ナトリウム及び0.1M2-メルカプトエタノールを含有する6Mグアニジンチオシアネート液で溶解しホモジナイズした。このホモジネートを0.1MEDTA含有5.7M塩化セシウム水溶液上に重層し、超遠心分離機（RPS27-2ローター、日立工機）を用い26,500rpmで20時間遠心し全RNA画分をペレットとして得た。これを0.35M NaCl、20mM Tris-HCl 及び20mMEDTAを含む7M尿素液の少量に溶解し、エタノール沈殿として回収した。

【0086】この全RNA画分から実施例1-(1)に示した方法に従って、オリゴ(dT)セルロースを用いる吸着カラムクロマトグラフィーによりポリ(A)mRNAを得た。ここで得たポリ(A)mRNAをアガロー

50	55	60
Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala Thr Asn Gly Lys Val		
65	70	75
Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asp Asp		
85	90	95
Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg		
100	105	110
Ser Ser Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg		
115	120	125
Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile		
130	135	140
Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu		
145	150	155
Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp		
165	170	175
Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr		
180	185	190
Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro		
195	200	205
Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe		
210	215	220
Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro		
225	230	235
Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly		
245	250	255
Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala		
260	265	270

【0092】配列番号: 3

配列の長さ: 900

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

細胞の種類: ヒト急性骨髄性白血病株細胞

セルライン: HL-60

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 61..876

特徴を決定した方法: E

配列

CAAGCTGCCA GCCAGAGAGG GAGTCATTTC ATTGGCGTTT GAGTCAGCAA AGAAGTCAAG	60
ATG GCC AAA GTT CCA GAC ATG TTT GAA GAC CTG AAG AAC TGT TAC AGT	108
Met Ala Lys Val Pro Asp Met Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser	
1 5 10 15	
GAA AAT GAA GAA GAC AGT TCC TCC ATT GAT CAT CTG TCT CTG AAT CAG	156
Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln	
20 25 30	
AAA TCC TTC TAT CAT GTA AGC TAT GGC CCA CTC CAT GAA GGC TGC ATG	204
Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu Gly Cys Met	
35 40 45	
GAT CAA TCT GTG TCT CTG AGT ATC TCT GAA ACC TCT AAA ACA TCC AAG	252
Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys	
50 55 60	
CTT ACC TTC AAG GAG AGC ATG GTG GTA GTA GCA ACC AAC GGG AAG GTT	300
Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala Thr Asn Gly Lys Val	

65	70	75	80	
CTG AAG AAG AGA CGG TTG AGT TTA AGC CAA TCC ATC ACT GAT GAT GAC				348
Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asp Asp				
85	90	95		
CTG GAG GCC ATC GCC AAT GAC TCA GAG GAA GAA ATC ATC AAG CCT AGG				396
Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg				
100	105	110		
TCA TCA CCT TTT AGC TTC CTG AGC AAT GTG AAA TAC AAC TTT ATG AGG				444
Ser Ser Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg				
115	120	125		
ATC ATC AAA TAC GAA TTC ATC CTG AAT GAC GCC CTC AAT CAA AGT ATA				492
Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile				
130	135	140		
ATT CGA GCC AAT GAT CAG TAC CTC ACG GCT GCT GCA TTA CAT AAT CTG				540
Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu				
145	150	155	160	
GAT GAA GCA GTG AAA TTT GAC ATG GGT GCT TAT AAG TCA TCA AAG GAT				588
Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp				
165	170	175		
GAT GCT AAA ATT ACC GTG ATT CTA AGA ATC TCA AAA ACT CAA TTG TAT				636
Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr				
180	185	190		
GTG ACT GCC CAA GAT GAA GAC CAA CCA GTG CTG CTG AAG GAG ATG CCT				684
Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro				
195	200	205		
GAG ATA CCC AAA ACC ATC ACA GGT AGT GAG ACC AAC CTC CTC TTC TTC				732
Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe				
210	215	220		
TGG GAA ACT CAC GGC ACT AAG AAC TAT TTC ACA TCA GTT GCC CAT CCA				780
Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro				
225	230	235	240	
AAC TTG TTT ATT GCC ACA AAG CAA GAC TAC TGG GTG TGC TTG GCA GGG				828
Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly				
245	250	255		
GGG CCA CCC TCT ATC ACT GAC TTT CAG ATA CTG GAA AAC CAG GCG				873
Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala				
260	265	270		
TAGGTCTGGA GTCTCACTTG TCTCACT				900

【0093】配列番号：4

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

配列

CGTCCATGTC CA

12

【0094】配列番号：5

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

配列

AACTAGTACG CAAGTTCACG TAAAAAGGGT AT

32

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

他の情報：3 から12まで相補的で、他の鎖には13から16にTCGAが存在する。

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

他の情報：1 から32まで相補的で、他の鎖には33から34にGCが存在する。

【図面の簡単な説明】

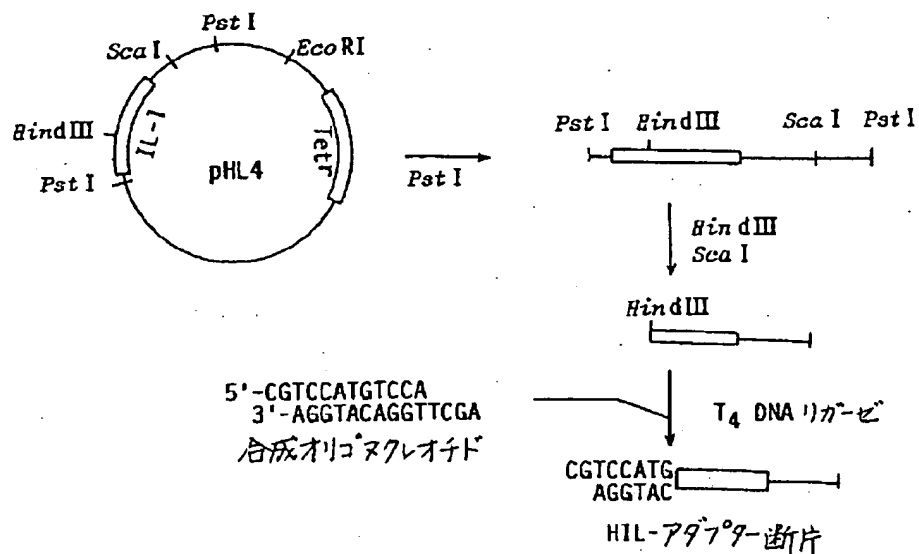
【図1】 形質発現ベクターpHLP101の構築工程の一部であり、HIL-アダプター断片の構築を示す。

【図2】 形質発現ベクターpHLP101の構築工程の一部であり、trpプロモーター断片の構築を示す。

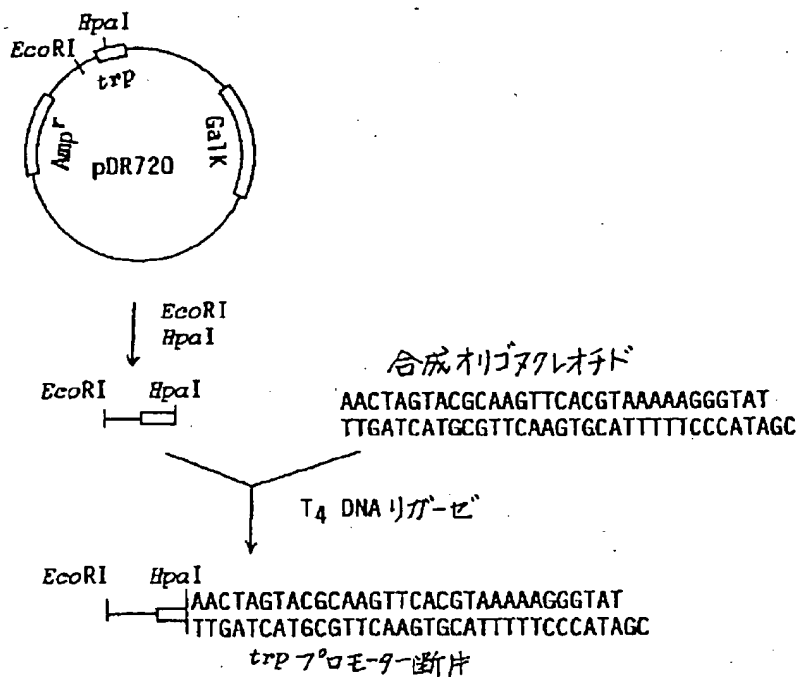
一部であり、trpプロモーター断片の構築を示す。

【図3】 形質発現ベクターpHLP101の構築工程を示す。

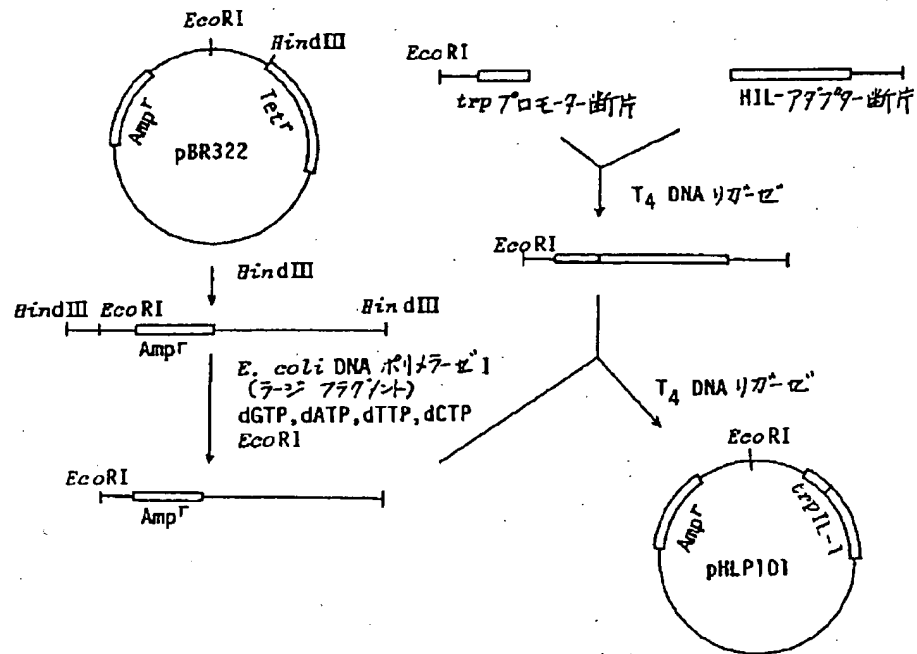
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵

// C 1 2 N 15/25

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

識別記号

Z N A

庁内整理番号

F I

技術表示箇所